KALLIKREIN AUS SCHWEINENIEREN:
Nachweis, Verteilung im Nierenparenchym, Anreicherung und Vergleich mit hochgereinigten Kallikreinen

Brunolf Briegel

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0019

AUS DEM

INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE UND KLINISCHE BIOCHEMIE

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. Werle

K A L L I K R E I N A U S S C H W E I N E N I E R E N :

Nachweis, Verteilung im Nierenparenchym, Anreicherung und Vergleich mit hochgereinigten Kallikreinen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

B R U N O L F B R I E G E L

aus Ottobeuren

München 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.7.1974

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A: Einleitung	1
I Kurze Betrachtung des Kallikrein-Kinin-Systems	1
I-1 Retrospektive auf die Kallikreinforschung	1
I-2 Wirkungsweise der Kallikreine	2
I-2-1 Kininliberierung	2
I-2-2 Esterolytische Aktivität	3
I-2-3 Aktivierung der Kallikreine	3
I-2-4 Inaktivierung der Kallikreine	3
I-2-5 Schema: Übersicht über das Ineinandergreifen der Komponenten des Kallikrein-Kininsystems	4
I-3 Definition der Kallikreine	5
I-4 Vorkommen der Kallikreine	5
II Nierenkallikrein	6
II-1 Beziehungen zwischen Nieren- und Harnkallikrein	6
II-2 Arbeiten über Nierenkallikrein	8
III Ziel dieser Arbeit	10
B: Arbeitsmethoden	11
I Präparation der Nieren	11
II Präparation der Homogenate und Probelösungen	11

III Meßmethoden 12

III-1 Wahl und Problematik der Meßmethoden 12

III-2 Ausführung der Messungen 14
III-2-1 Hundeblutdrucktest 14
III-2-2 Spektrophotometrische Bestimmung mit der BAEE-ADH-Methode 15
III-2-3 Hemmung von Kallikrein durch Inhibitoren 16

III-3 Verwendete Einheiten 16
III-3-1 Esterolytische Einheit 16
III-3-2 Biologische Kallikreineinheit 17

IV Proteinbestimmung 17

V Gelfiltration 18

C: Ergebnisse 19

I Nachweis von Nierenkallikrein beim Schwein 19

II Aktivierung des Nierenkallikreins 26

III Verteilung der Kallikreinaktivität im Nierenparenchym 31

IV Herstellung eines angereicherten Nierenpräparates 34

V Vergleich des angereicherten Nierenpräparates mit reinsten Kallikreinen 38

V-1 Verhalten gegenüber Inhibitoren 39
V-1-1 Hemmspektrum verschiedener Kallikreine 39
V-1-2 Hemmkurve mit Trasylol 40

V-2 Enzymkinetische Untersuchung verschiedener Organkallikreine 42

V-3 Vergleich zwischen biologischer und esterolytischer Aktivität 47

D: Rückblick und Erläuterung der Ergebnisse 52

Literatur 54

A : E I N L E I T U N G

I Kurze Betrachtung des Kallikrein-Kinin-Systems

I-1 Retrospektive auf die Kallikreinforschung (1)

Bei experimentellen Studien über die reflektorische Anurie fand 1925 E.K.Frey im Harn von Säugetieren eine Substanz, die nach intravenöser Injektion beim Hund eine starke Blutdrucksenkung hervorrief. Später wurde im Pankreas ein Stoff mit ähnlicher Wirkung gefunden. Da man annahm, daß das Pankreas das Quellgebiet dieser Substanz sei, nannte man sie Kallikrein nach καλλίκρεας, dem griechischen Wort für Pankreas. Ähnlich wirkende Substanzen, die in vielen anderen Organen und im Blut später gefunden wurden, bezeichnete man dann ebenfalls als "Kallikreine".
Von großer Bedeutung war die Entdeckung der Kallikreininhibitoren, die zuerst im Blutplasma und Wiederkäuerorganen von Frey, Kraut und Werle aufgefunden wurden.

1936 fand Werle, daß durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum eine Substanz entsteht, die den isolierten Meerschweinchendarm kontrahiert, was Kallikrein selbst nicht bewirkt. Daraus ergab sich die Erkenntnis, daß Kallikrein enzymatisch auf ein Substrat des Serums (Kininogen) einwirkt und glatte Muskeln kontrahierende Spaltprodukte (Kinine) liberiert.
Nach der Entdeckung der Kininasen durch Werle war der

erste Abschnitt der Erforschung des Kallikrein-Kinin-Systems abgeschlossen.

I-2 Wirkungsweise der Kallikreine

I-2-1 Kininliberierung (2,3,4)

Die biologische Wirkung der Kallikreine beruht auf der proteolytischen Abspaltung eines Polypeptids (Kinin) aus einem Eiweiß des Blutplasmas, das der α_2-Globulinfraktion angehört. Die Kinine sind pharmakologisch hochwirksame Peptide. Sie bewirken unter anderem Vasodilatation, Kontraktion glattmuskulärer Organe und Schmerz. Diese Wirkungen benutzt man zur biologischen Bestimmung der Kallikreinaktivität. Es sind zwei Meßmethoden möglich.

Die erste besteht darin, daß man einem narkotisierten Tier Kallikrein intravenös injiziert. Aus dem Kininogen des Versuchstieres wird nun Kinin liberiert, das Vasodilatation und somit eine Blutdrucksenkung bewirkt. Die Höhe der Blutdrucksenkung ermöglicht dann den Schluß auf die injizierte Kallikreinmenge.

Bei der zweiten biologischen Bestimmungsmethode läßt man Kallikrein auf ein speziell vorbehandeltes Plasma (Horton Substrat) einwirken und schließt dann aus der Intensität der Kontraktion auf die Kallikreinmenge.

Beide Meßarten sind ziemlich aufwendig und leicht durch

zahlreiche Störfaktoren beeinflußbar.

I-2-2 Esterolytische Aktivität (5,6)
Neben Kininogen spalten Kallikreine Aminosäureester, wie BAEE (Benzoyl-L-argininäthylester) oder TAME (Toluolsulfonyl-L-arginin-methylester). Aus der Spaltung des BAEE in Benzoylarginin und Äthanol durch Kallikrein ergeben sich mehrere Möglichkeiten einer Aktivitätsbestimmung des Kallikreins.

I-2-3 Aktivierung der Kallikreine (1,7)
Die Kallikreine entstehen aus den inaktiven Präkallikreinen. Über die physiologische Aktivierung der Gewebskallikreine ist wenig bekannt. Trypsin könnte eventuell der Aktivator von Pankreaspräkallikrein sein. In die Aktivierung von Serumkallikrein ist wahrscheinlich der Hagemann-Faktor eingeschaltet. (7)
In vitro lassen sich die Gewebskallikreine durch verschiedene Methoden aktivieren. Beschrieben sind Aktivierungen durch Trypsin, Verdünnen des Extrakts, Acetonbehandlung und Ansäuern.

I-2-4 Inaktivierung der Kallikreine (1,8)
Die Inaktivierung der Kallikreine vollzieht sich entweder durch irreversiblen chemischen Umbau oder durch Bildung eines reversiblen Komplexes mit einem Inhibitor. Im menschlichen Serum sind zwei wirksame inhibierende

Prinzipien bekannt.

Reversible Inhibitoren für Kallikreine kommen in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben vor.(8) Mit Hilfe der Inhibitoren ist es möglich Kallikreine verschiedener Quellen zu unterscheiden.

I-2-5 Schema: Übersicht über das Ineinandergreifen der Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems

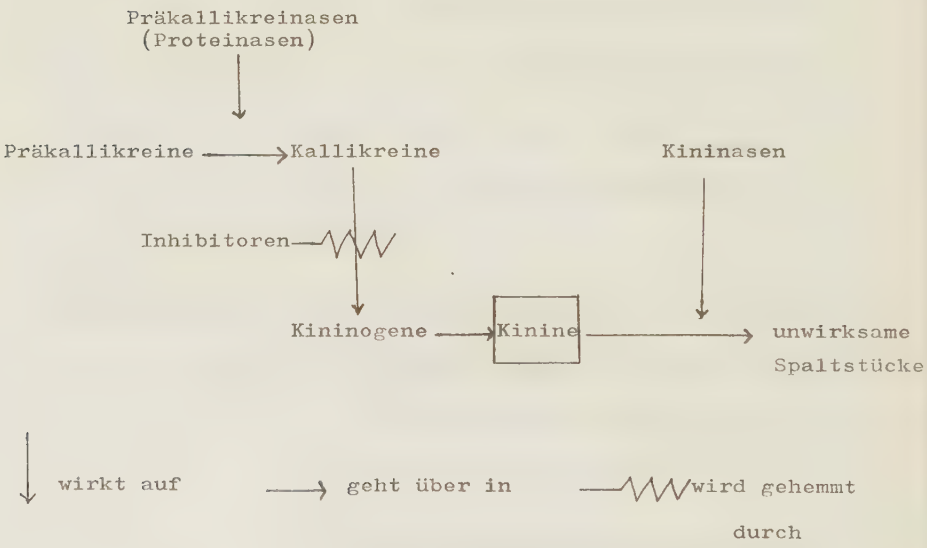

Abbildung 1

I-3 Definition der Kallikreine (1,9)

Die im Tierreich weit verbreiteten Kallikreine unterscheiden sich sehr in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Es bereitet daher Schwierigkeiten eine eindeutige Definition für "Kallikrein" zu finden. Die "Comission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" gab den Kallikreinen die Systemnummer EC 3.4.4.21. und definierte Kallikreine als Enzyme, die aus Kallidinogen Kallidin (ein spezielles Kinin) freisetzen. Diese Definition ist unbefriedigend, da eine Reihe von Kininogenasen, die andere Kinine liberieren, nicht erfaßt werden. Man ist daher übereingekommen solche Kininogenasen Kallikreine zu nennen, die von ihren Entdeckern so bezeichnet wurden.

I-4 Vorkommen der Kallikreine (1,10)

Das Vorkommen von Kallikreinen wurde bisher eingehender bei Mensch, Säugetieren und Vögeln untersucht. Beim Menschen und den Säugetieren kommt das Enzym in Plasma, Darm und Pankreas als Präenzym, in den Mundspeicheldrüsen und im Harn in aktiver Form vor. In geringer Konzentration ist das Enzym wahrscheinlich noch in vielen anderen Geweben vorhanden.

II Nierenkallikrein

II-1 Beziehungen zwischen Nieren- und Harnkallikrein

Kallikrein wird im Harn in aktiver Form in erheblichen Mengen ausgeschieden. Im Harn von Schweinen finden sich ca.2 FU/ml und im Harn von Menschen ca. 0,2 FU/ml.(1)
Die Frage woher diese erhebliche Kallikreinmenge kommt, ist nicht eindeutig geklärt. Es sind prinzipiell zwei Möglichkeiten gegeben. Entweder wird Harnkallikrein in der Niere selbst gebildet oder von der Niere aus dem Blut aufgenommen und hierauf sezerniert. Für eine Bildung von Harnkallikrein in der Niere sprechen mehrere Beobachtungen. So scheiden Patienten mit akuter Pankreatitis, einer Krankheit bei der erhebliche Mengen Kallikrein ins Blut übertreten, nicht vermehrt Harnkallikrein aus. Auch führt eine Infusion von großen Mengen Pankreaskallikrein (Padutin^{R}) beim Menschen oder der Ratte zu keiner Erhöhung der Harnkallikreinausscheidung.(1)
Werle nimmt an, daß Harnkallikrein wahrscheinlich in den proximalen Tubuli der Niere gebildet wird, da nach selektiver Schädigung der proximalen Tubuli die Ausscheidung von Harnkallikrein abnimmt. Auch bei tubulären Erkrankungen nimmt die Ausscheidung von Harnkallikrein ab.(11)
Für eine Kallikreinfunktion in der Niere sprechen Beobachtungen, die nach Nierentransplantationen gemacht wurden.

Einer Abstoßung der transplantierten Niere geht immer die Abnahme der Harnkallikreinausscheidung voraus.(12)
Die Kallikreinausscheidung im Harn wird durch die Nahrung beeinflußt. Ernährungsversuche an Ratten zeigten, daß die Kallikreinausscheidung bei Fütterung von Fleisch, Ei oder Milchpulver stark ansteigt und signifikant unter die Norm bei Fettfütterung sinkt.(13)
Neben dem Einfluß der Nahrung wurden auch hormonelle Einflüsse auf die Höhe der Kallikreinausscheidung im Harn festgestellt. Die Versuche sprechen für eine Regulation der Kallikreinausscheidung im Harn über Hypophyse (ACTH) ⟶ Nebenniere (Glucocortikoide).(14) Nach Thyroxingaben wurde auch eine vermehrte Kallikreinausscheidung beobachtet.(1)
Über die physiologische Rolle des Kallikreinsystems in der Niere gibt es verschiedene Vorstellungen. Denkbar wäre eine Beteiligung an der Autoregulation der Durchblutung der Niere, etwa als Gegenspieler zum Renin-Angiotensinsystem.(15) Diskutiert wird auch eine Einflußnahme auf die Transportleistung des Nierenparenchyms oder die Peristaltik der Harnwege.(1)
Nach Nierenextirpationen steigt der Plasmakininogenspiegel auf den dreieinhalbfachen Wert an.(27) Man könnte dies auf einen konstanten Verbrauch von Plasmakininogen durch das Nierenkallikrein zurückführen. Falls dies der Fall wäre, könnte die Niere durch kontinuierliche Inkretion von aktivem Kallikrein eine permanente Blutdrucksenkung

auslösen. Bei degenerativen pathologischen Erscheinungen der Niere könnte die Kallikreinabgabe an das Blut vermindert sein, was zu einem Ansteigen des Blutdrucks gegenüber der Norm führen müßte. Vielleicht ist dies der pathogenetische Hintergrund für einige in der Klinik beobachtete renal bedingte Hochdruckformen.
Eine andere physiologische Rolle des Kallikreins vermutet Murakami. Er beobachtete die Zunahme eines kallikreinähnlichen Enzyms im Harn und im Blut nach körperlicher Anstrengung. Basierend auf dieser Beobachtung stellte er die Hypothese auf, daß Kallikrein von parenchymalen Organen durch Hypoxie freigesetzt und dann durch die Niere ausgeschieden würde.(16,17)

II-2 Arbeiten über Nierenkallikrein

Obwohl Nierenkallikrein eine große physiologische Bedeutung haben könnte, liegen bisher nur wenige wissenschaftliche Arbeiten über Nierenkallikrein vor.
1961 zeigten Werle und Vogel, daß durch Trypsinbehandlung in Rattennieren 2-8 FU Kallikrein aus Präkallikrein freizusetzen sind.
Genauere Untersuchungen führten 1963-1966 Carvalho und Diniz durch.(18-21) Sie fanden in Rattennieren eine inaktive Kininogenase, die sie durch Behandlung in hypotonem Medium bei saurem pH-Wert aktivierten. Sie stellten auch Ähnlich-

keiten zwischen Harnkallikrein und der aufgefundenen Kininogenase im Verhalten gegenüber Inhibitoren fest. In Sedimentationsmessungen zeigten sie, daß die enzymatische Aktivität wahrscheinlich in den Lysosomen lokalisiert ist.

1970 wandte sich K.Nustad dem Problem zu. Seine Versuchstiere waren ebenfalls Ratten. Er fand die Kininogenaseaktivität im Niederschlag des Homogenats. Durch Behandlung mit Desoxycholsäure im Alkalischen erhielt er aus dem Niederschlag das aktive Enzym. Bezüglich der Molekülgröße, dem Effekt von Inhibitoren und dem pH-Optimum bei der Kininliberierung stellte er große Ähnlichkeit zwischen Harn- und Nierenkallikrein fest. Die Kininogenaseaktivität fand er hauptsächlich in der Nierenrinde. Im Gegensatz zu Diniz und Carvalho vermutete er die subzelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum oder den Plasmamembranen. Renin fand er in den Mitochondrien. Er stellte auch fest, daß die Kininogenaseaktivität mit der BAEE-Hydrolyse parallel lief. Ihm gelang es aber nicht bei der Ratte durch Injektion einer Probe der Nierenkininogenase eine meßbare Blutdrucksenkung auszulösen, da der Kininogenasegehalt zu gering für diese Meßmethode war. (21,22,23)

Nierenkallikrein wurde 1969 von einem japanischen Team bei Untersuchungen über den Kallikreingehalt verschiedener Organe nachgewiesen, allerdings keiner näheren Betrachtung unterzogen.(24)

III Ziel dieser Arbeit

Im Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie der Universität München wurden in den letzten Jahren hochgereinigte Präparate von Pankreas-, Submandibularis-, Harn- und Serumkallikrein aus Schweineorganen isoliert.

Das Ziel dieser Arbeit war, ein möglichst reines Präparat aus der Niere zu gewinnen und dann dieses mit den hochgereinigten Präparaten zu vergleichen, um Erkenntnisse über die Natur des Nierenkallikreins zu erhalten.

Da der Kallikreingehalt der Schweineniere geringer als erwartet war und bei der Isolierung unvorhersehbare Schwierigkeiten auftraten, mußten wir uns mit einer geringen Anreicherung des Nierenkallikreins begnügen. Das erhaltene Präparat ermöglichte dennoch interessante Vergleiche mit den hochgereinigten Präparaten.

B : A R B E I T S M E T H O D E N

I Präparation der Nieren

Frisch geschlachteten Schweinen wurden im Schlachthof die Nieren entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Nierenarterie erhalten blieb. Die Schweine waren völlig ausgeblutet, da ihnen zuvor die Halsschlagader eröffnet worden war und sie an den Hinterbeinen aufgehängt waren. Um letzte Blutreste aus den Nierengefäßen zu entfernen, banden wir in die Arteria renalis einen Polyäthylenschlauch ein und perfundierten die Nieren mit je 500ccm Spüllösung bei einem Arbeitsdruck von etwa 120cm Wassersäule. Die Spüllösung bestand aus 0,9% NaCl, 5g% Dextran (mittleres Molekulargewicht 40000) und 120IE Heparin (Vetren^{R}) pro Liter. Salz- und Zuckerlösungen verschiedener Osmolarität erwiesen sich als ungeeignet, da die aktivierbare Kallikreinmenge allem Anschein nach absank und die Nieren stark aufquollen. Bei Verwendung der oben genannten Spüllösung veränderten sich die Konsistenz und das Gewicht der Niere nicht wesentlich.

II Präparation der Homogenate und Probelösungen

Die frisch entbluteten Nieren wurden in Fraktionen unter-

teilt. In den meisten Experimenten wurde nur Nierenrinde verwendet und das Nierenmark verworfen. Die Gewebestücke wurden nun gewogen und im Verhältnis 1:5 (1Gewichtsteil Gewebe + 4Volumenteile Pufferlösung) in den jeweils angegebenen Lösungen homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde der pH-Wert des Homogenats genau eingestellt.
Das Homogenat wurde nun bei 4900 Umdrehungen 20 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand zur biologischen und photometrischen Kallikreinbestimmung verwendet. Bei sehr trüben Homogenaten arbeiteten wir bei höheren Umdrehungszahlen.
Um den pH-Wert 8,7 in der Küvette zu gewährleisten, stumpften wir saure Homogenate durch Zugabe von festem Natriumbikarbonat ab. Die Überprüfung des pH-Werts in der Küvette erfolgte mit Indikatorpapier.

III Meßmethoden

III-1 Wahl und Problematik der Meßmethoden

Als biologische Testmethode benutzten wir den Hundeblutdrucktest. Die Senkung des Blutdrucks im großen Kreislauf ist bei dieser Meßmethode ein Maß für das aus dem Kininogen des Hundes liberierte Kinin.
Es zeigte sich, daß diese Meßmethode mit vielen Nachteilen

behaftet ist. Höhere Salzkonzentrationen in der Testprobe oder biogene Amine, die durch mikrobielles Wachstum entstanden waren, erzeugten ähnliche Blutdrucksenkungen wie Kallikrein. Die Ursache einiger Blutdrucksenkungen, die mit Sicherheit nicht durch Kallikrein hervorgerufen waren, konnte nicht geklärt werden.

Gegenüber dem Test am isolierten Rattenuterus besaß der Hundetest auch Vorteile. Es war bei dieser Meßart nicht notwendig, die im Nierenhomogenat vorhandenen Kininasen zu hemmen oder abzutrennen. Auch konnte Kallikrein nicht mit Renin, das eine Blutdrucksteigerung bewirkt, verwechselt werden.

Die größte Schwierigkeit bei dieser Meßmethode bestand somit darin, eine ausgelöste Blutdrucksenkung eindeutig einer Kallikreinwirkung zuzuordnen. Wenn die Blutdrucksenkung mit Trasylol im Alkalischen total zu unterdrücken war und nach Erhitzen ebenfalls verschwunden war, sahen wir es als erwiesen an, daß die Wirkung durch Kallikrein hervorgerufen wird.

Für die Bestimmung der BAEE-esterolysegeschwindigkeit boten sich mehrere Methoden an.(25) Wir benutzten die "indirekte Methode",bei der das freigesetzte Äthanol mit Alkoholdehydrogenase und NAD umgesetzt wird.

Der Vorteil dieser Methode war, daß sehr geringe Aktivitäten noch bestimmt werden konnten. Die große Schwierigkeit bestand jedoch darin, die dem Nierenkallikrein zugehörige

BAEE-esteraseaktivität zu erfassen. In der Niere waren nämlich weitere Esterasen vorhanden, die BAEE ebenfalls umsetzten. Außerdem war die Extinktionsänderung durch weitere nicht zu übersehende Störfaktoren beeinflußt. So zeigten Vorversuche, daß eine Extinktionsänderung auch ohne Zugabe von BAEE oder ADH bei manchen Homogenaten auftrat.

Wir setzten deshalb voraus, daß Schweinenierenkallikrein von Trasylol gehemmt wird, da sämtliche bekannten Gewebskallikreine des Schweins durch Trasylol gehemmt werden. Durch Vergleich zweier Küvettenansätze, die gleiche Konzentrationen an Reagenzien und Probe enthielten, wobei aber einem Ansatz Trasylol zugefügt war, war es möglich eine durch Trasylol hemmbare BAEE-esteraseaktivität abzugrenzen. Diese Aktivität konnte als dem Kallikrein zugehörig identifiziert werden.

III-2 Ausführung der Messungen

III-2-1 Hundeblutdrucktest

Ein 5-10 kg schwerer Hundebastard wurde mit Nembutal^{R} narkotisiert und mittels eines endotrachealen Tubus künstlich beatmet. In die Arteria carotis wurde ein Kunststoffschlauch eingebunden, der mit Vetren^{R} (je 200 I.E. Heparin, Promonta) zur Verhinderung der Blutgerinnung gefüllt war. Der Schlauch wurde an ein Statham Element

angeschlossen, das die fortlaufende Registrierung des Blutdrucks an einem angeschlossenen Schreiber erlaubte. Über einen Katheder, der in die Vena femoralis eingebunden war, wurden die Testsubstanzen zugeführt. Die von den Proben ausgelöste Blutdrucksenkung wurde mit der Blutdruckwirkung eines Standards (Harn- oder Pankreaskallikrein bekannter Aktivität) verglichen. Es waren je nach Ansprechbarkeit des Kreislaufs 0,1-0,4 FU nötig, um eine für einen Vergleich ausreichende Blutdrucksenkung hervorzurufen. Zwischen den Applikationen war eine Pause von etwa 15 Minuten nötig, um wieder eine gleiche Empfindlichkeit gegenüber Kallikrein zu erhalten. Bei Verwendung unreiner Nierenpräparate nahm die blutdrucksenkende Wirkung von Probe zu Probe rasch ab. Dies war wahrscheinlich auf die in den Nierenhomogenaten enthaltenen Kininasen zurückzuführen.

III-2-2 Spektrophotometrische Bestimmung mit der BAEE-ADH-Methode

Bei dieser Methode wurde das bei der Hydrolyse von BAEE entstandene Äthanol bestimmt, indem man mittels Alkoholdehydrogenase NAD zu NADH reduzierte und die Extinktionszunahme bei 366nm bestimmte. Gemessen wurde bei pH8,7. Als Puffer diente ein Gemisch aus Semicarbazid, Glycin und Natriumpyrophosphat. Die Meßmethode ist von mehreren Autoren ausführlich beschrieben worden.(25)

Für die Messungen wurden die in der Literatur angegebenen Konzentrationen benutzt. Die BAEE-Konzentration in der Küvette betrug im allgemeinen 1mM. Wurde mit einer anderen Konzentration gearbeitet, so ist dies gesondert vermerkt.

III-2-3 Hemmung von Kallikrein durch Inhibitoren

In einer Küvette (Vol.3ml) wurden Pufferlösung, Inhibitor und Probelösung vorinkubiert. Der Inhibitor wurde kurz vor der Messung in der verwendeten Pufferlösung (pH8,7) gelöst. Nach 30 Minuten wurden die übrigen zum Test notwendigen Substanzen, nämlich die NAD- ,BAEE- und ADH-Lösung zugegeben und die erfolgende Extinktionsänderung bei 366nm gemessen.

III-3 Verwendete Einheiten

III-3-1 Esterolytische Einheit

Die esterolytische Aktivität wurde in internationalen Einheiten (U) angegeben. Dabei bedeutet 1U die Menge Enzym, die pro Minute ein Mikromol Substrat umsetzt. Die Meßbedingungen waren in der Literatur in Bezug auf die BAEE-Konzentration nicht eindeutig definiert. Wir gaben daher die BAEE-Konzentrationen, bei denen gemessen wurde, im einzelnen an. Im allgemeinen arbeiteten wir bei 1mM BAEE-Konzentration in der Küvette.

III-3-2 Biologische Kallikreineinheit

Als biologische Kallikreineinheit verwendeten wir die Frey Unit (Abk.:FU). 1FU entspricht der blutdrucksenkenden Wirkung von 5ml Menschenharn, der gegen fließendes Wasser dialysiert wurde und einer großen Sammelprobe entnommen wurde.

Da dieser Standard umständlich zu gewinnen und mit Schwankungen behaftet war, verwendeten wir reines Pankreaskallikrein als Standard. Die blutdrucksenkende Wirkung von 100mU reinem Pankreaskallikrein, bestimmt bei 0,5mM BAEE-Konzentration im indirekten Test, wurden in den durchgeführten Messungen mit 1FU gleichgesetzt.

Die Größenordnung der auf diese Weise definierten Einheit stimmte sehr gut mit der ursprünglichen Definition überein. Standardlösungen mit gleicher blutdrucksenkender Wirkung waren auf diese Weise leicht herzustellen.

IV Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung führten wir mit der Biuretmethode durch.(26) Als Eichsubstanz verwendeten wir Rinderserumalbumin.

V Gelfiltration

Die notwendigen Gelfiltrationen führten wir nach den von Pharmacia angegebenen Richtlinien durch.(28)

C : E R G E B N I S S E

I Nachweis von Nierenkallikrein beim Schwein

Der Nachweis von Nierenkallikrein beim Schwein war schwierig und zeitraubend. Zahlreiche Versuche am Hund erwiesen sich als Fehlschläge. Dies lag vor allem daran, daß wir den Kallikreingehalt der Schweineniere nicht kannten und, wie sich später herausstellte, weit überschätzten. Auch zeigte sich später, daß nach zuviel Applikation von Nierenhomogenat das Versuchstier auf Kallikrein kaum mehr reagierte. Wir versuchten daher Nierenkallikrein erst spektralanalytisch zu erfassen. Nachdem wir so mit Hilfe des Photometers eine Substanz angesprochen hatten, gelang uns dann im biologischen Test ein eindeutiger Nachweis des Kallikreins.

Zuerst stellten wir mittels mehrerer Puffersysteme Homogenate bei verschiedenen pH-Werten her. Im spektralanalytischen Test zeigten dann Proben, die in saurem oder alkalischem Milieu aktiviert worden waren, das in Diagramm 1 dargestellte Verhalten der BAEE-esteraseaktivität.

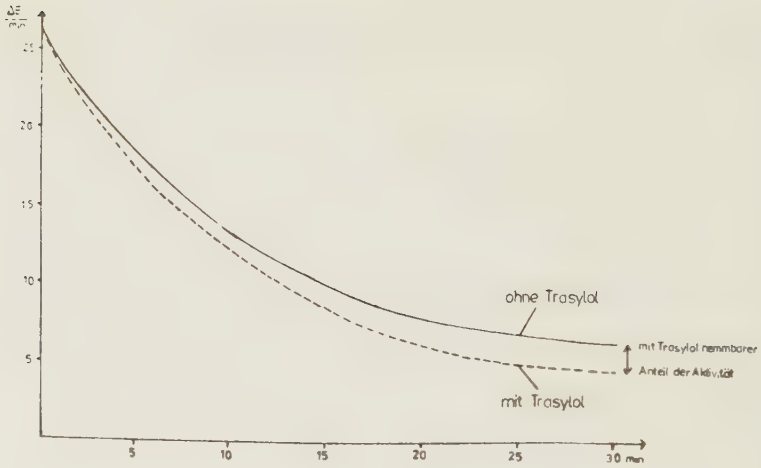

Diagramm 1: Verhalten der BAEE-esteraseaktivität in Nierenhomogenaten

Die BAEE-hydrolysegeschwindigkeit nahm kontinuierlich ab, bis sie sich nach etwa 20 Minuten einem konstanten Wert asymptotisch annäherte. Eine Küvette, die ansonsten die gleichen Konzentrationen an Reagenzien und Probe, jedoch zusätzlich 250 Mikrogramm Trasylol enthielt, zeigte eine abweichende Extinktionsänderung.(gestrichelte Linie) Die BAEE-hydrolysegeschwindigkeit näherte sich ebenfalls

einem konstantem Wert an, der aber deutlich geringer als der ohne Trasylolzugabe erhaltene Wert war.
Wir deuteten das Ergebnis folgendermaßen: Durch die Behandlung im sauren oder alkalischen Milieu wurden mehrere BAEE-esterasen aktiviert. Durch die Umstellung des pH-Wertes auf 8,7 und die Verdünnung in der Küvette wurde eine BAEE-esterase inaktiviert. Diese Inaktivierung bewirkte die Abnahme der BAEE-esteraseaktivität. Von der verbleibenden BAEE-hydrolyseaktivität war der durch Trasylol hemmbare Anteil auf die BAEE-esteraseaktivität des Kallikreins zurückzuführen, da dieses durch die hohe Trasylolkonzentration total gehemmt wurde. Die restliche BAEE-esteraseaktivität war entweder auf eine weitere BAEE-esterase oder auf den Test störende Faktoren zurückzuführen.

Inkubierten wir nun Probe und Puffer in einer Küvette und in einer anderen Küvette Probe, Puffer und Trasylol 20 Minuten lang und setzten dann erst die Reagenzien zu, so erhielten wir lineare Extinktionsänderungen. In der Küvette, die bei sonst gleicher Zusammensetzung 250 Mikrogramm Trasylol enthielt, war die Extinktionsänderung geringer.(siehe Diagramm 2)

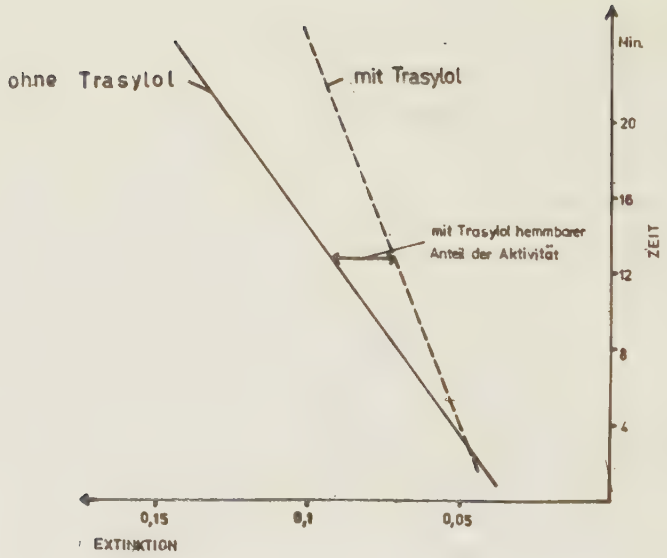

Diagramm 2: Extinktionsänderung der Nierenhomogenatüberstände nach 20 Minuten Vorinkubation in der Meßküvette

Den durch Trasylol hemmbaren Anteil der BAEE-esterase-aktivität schrieben wir dem Nierenkallikrein zu.
Mit dem Blutdrucktest stellten wir nun die biologische Wirkung am Hund fest. Als Vergleichssubstanz benutzten wir Harnkallikrein, dessen Aktivität wir mit der gleichen Methode bestimmten.(Ergebnis siehe Abbildung 2)

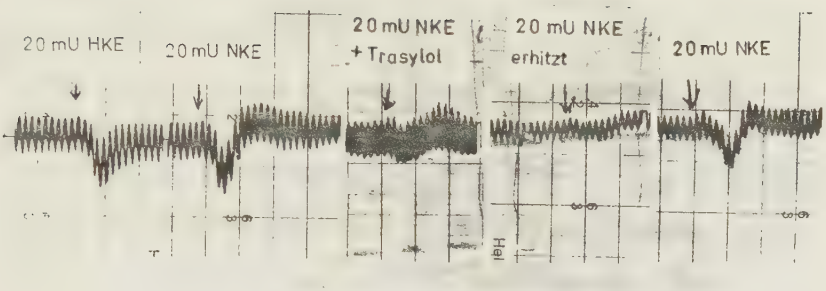

Abbildung 2: Nachweis von Nierenkallikrein im Hundeblutdrucktest
(HKE = Harnkallikrein, NKE = Nierenkallikrein)

Der mit Trasylol hemmbare Anteil der BAEE-esteraseaktivität der Nierenprobe stimmte in der Blutdruckwirkung mit einer Harnkallikreinprobe gleicher esterolytischer Aktivität überein. Da die Blutdrucksenkung durch Trasylol hemmbar und durch Erhitzen zu verhindern war, sahen wir es als erwiesen an, Kallikrein in unseren Messungen erfaßt zu haben.

Der Kallikreingehalt der Niere, bei der dieser Nachweis gelang, betrug etwa 90mU/gGewebe durch Trasylol hemmbare BAEE-esteraseaktivität. Bei anderen Nieren, die nur etwa 40mU/gGewebe enthielten, war die Blutdrucksenkung durch Trasylol nicht vollständig hemmbar. Dies lag wahrscheinlich daran, daß bei diesen Proben der Kallikreingehalt im Überstand entsprechend geringer war und so dem Hund

mehr Probe injiziert werden mußte. Die großen Probemengen führten dann zu einer Beeinträchtigung des Blutdrucks durch andere Faktoren.

Um auch in Nieren mit geringem Kallikreingehalt einen einwandfreien Kallikreinnachweis zu führen, reicherten wir das Nierenkallikrein durch Gelfiltration an einer mit Sephadex G75 gefüllten Säule an.

Damit eine ausreichende Probemenge auf die Säule aufgetragen werden konnte, war es notwendig, den Homogenatüberstand vorher einzuengen. Wir lyophilisierten deshalb eine größere Menge Überstand und lösten sie dann in einem möglichst geringem Volumen Puffer wieder auf. Eine Dialyse des Homogenats mußten wir unterlassen. Versuche zeigten nämlich, daß bei der Dialyse gegen Aqua dest. oder verschiedene Salzlösungen die Aktivität des Nierenkallikreins um 50-70% zurückging. Als Ursache dafür nahmen wir an, daß der entsprechende Anteil des Kallikreins von entgegengesetzt geladenen Proteinen mitgerissen wurde, die bei der Dialyse wegen des Entzugs von stabilisierenden Salzen ausfielen. Als Elutionsmittel für die Sephadexsäule verwendeten wir 0,05M Tris HCl, pH8,5 versetzt mit 0,1M KCl und 3mM Natriumazid.

Die aufgetragene Kallikreinmenge hatte eine Aktivität von 2100mU (mit Trasylol hemmbare BAEE-esteraseaktivität). Die nach der Passage der Säule in einem Fraktionssammler gesammelten Proben enthielten noch 970mU. Auch für diesen

Aktivitätsverlust waren wahrscheinlich ausfallende Proteine verantwortlich, die Kallikreinmoleküle mitrissen.
Bei dem angereicherten Präparat ließ sich die Blutdrucksenkung eindeutig mit Trasylol inhibieren. Wir sahen dies als eindeutigen Beweis an, daß wir mit unserer Meßmethode in allen Nierenextrakten Nierenkallikrein angesprochen hatten.(Abbildung 3)

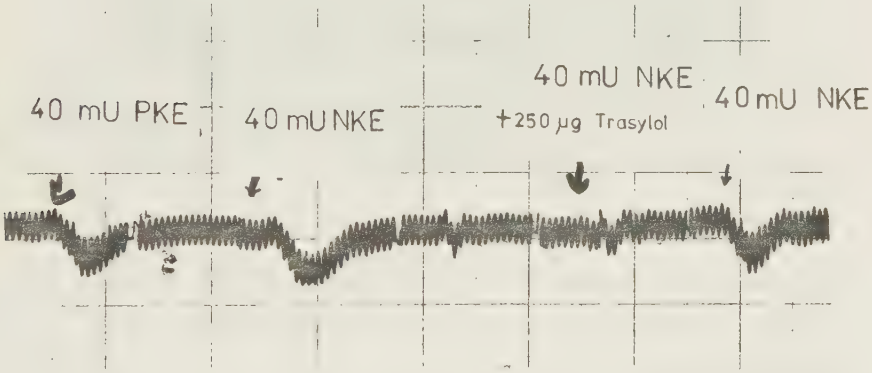

Abbildung 3: Nachweis von Nierenkallikrein nach Gelfiltration an Sephadex G75
(PKE = Pankreaskallikrein, NKE = Nierenkallikrein)

Die Möglichkeit, Plasmakallikrein erfaßt zu haben war mit größter Wahrscheinlichkeit auszuschließen, da sämtliche Nieren mit Dextranlösung gründlich entblutet waren. Weitere Untersuchungen zeigten dann später, daß das aufgefundene Nierenkallikrein sich deutlich in mehreren Eigenschaften von Plasmakallikrein unterschied.

II Aktivierungen des Nierenkallikreins

In mehreren Versuchsreihen suchten wir eine möglichst optimale Aktivierungsmethode für Nierenkallikrein zu finden.
Eine Aktivierung durch Trypsin, wie sie von Werle und Vogel (10) für die Rattenniere (2-8FU/gGewebe) beschrieben ist, gelang auch bei der Schweineniere. (Abbildung 4)

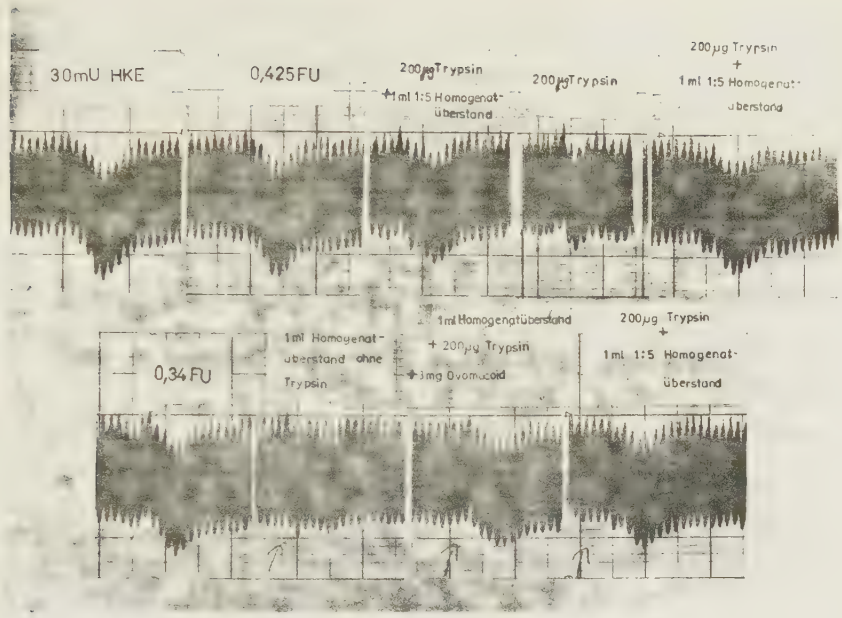

Abbildung 4: Aktivierung von Nierenkallikrein durch Trypsin (HKE = Harnkallikrein)

Aktivierte man ein Stück der gleichen Niere durch Erwärmen bei pH5 in 0,05M Acetatpuffer und 0,15M Saccharose, so erhielt man 40mU/gGewebe durch Trasylol inhibierbare BAEE-esteraseaktivität. Die durch Trypsin hervorgerufene Aktivierung war schwer zu beurteilen, da das eingesetzte Trypsin bereits selbst eine Blutdrucksenkung hervorrief. Mit Ovomucoid versuchten wir die blutdrucksenkende Wirkung des

Trypsins zu hemmen, um nur die Blutdruckwirkung des Kallikreins zu erhalten. Nach der in Abbildung 4 dargestellten Messung dürften ca.60-100mU/gGewebe Nierenkallikrein aktiviert worden sein.

Die durch Trypsinaktivierung erhaltenen Werte lagen also nicht erheblich über den durch andere Aktivierungsmethoden erhaltenen Aktivitäten.

Ein großes Problem beim Vergleich der verschiedenen Aktivierungsmethoden lag darin, daß kein gleichbleibendes Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Der Gehalt an aktivierbarem Kallikrein war nämlich von Niere zu Niere sehr unterschiedlich und zudem sank der Gehalt an aktivierbarem Kallikrein von der Rinde zum Mark stark ab.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis einer Meßreihe zusammengestellt. Dabei wurde von einer entbluteten Niere in gleicher Dicke die Rinde entfernt und in verschiedenen Lösungen homogenisiert. Die Aktivität des Überstandes wurde gemessen. Der Niederschlag wurde in 0,1n Essigsäure aufgeschwemmt und nochmals zentrifugiert. Hierauf wurde die Aktivität in diesem Überstand bestimmt.

Homogenisiert in:	mU/gGewebe durch Trasylol hemmbare BAEE-esterase-aktivität im Überstand	Nach Aufschwemmung des Niederschlags mit 0,1n Essigsäure durch Trasylol hemmbare BAEE-esteraseaktivität (mU/gGewebe)
0,15M Saccharose, 0,05M Acetat, pH5 (nach Diniz)	0 h erwärmt: 42 mU/gGew. 2 h erwärmt bei 37°C: 63 mU/gGew.	0 h erwärmt: 20mU/gGew. 2 h erwärmt bei 37°C: 15,5 mU/gGew.
0,1n Essigsäure, pH4	47 mU/gGew.	5mU/gGew.
0,5% Desoxycholsäure, Tris 0,05M, Saccharose 0,25M, pH7,5 (nach Nustad)	35 mU/gGew.	3 mU/gGew.
Kaliumrhodanid 5%, pH 6,5	35 mU/gGew.	6 mU/gGew.
Tra 0,1M, pH7,5, 0,1M NaCl	28 mU/gGew.	9 mU/gGew.
Lithiumrhodanid 5%, pH6,5	19 mU/gGew.	6 mU/gGew.
H_2O, pH6,9 im Überstand	0 mU/gGew.	19 mU/gGew.

Tabelle 1

Sowohl im alkalischen als auch im sauren Bereich trat eine Aktivierung ein. Am günstigsten erwies sich die Aktivierung nach Diniz, bei der das Homogenat in 0,15M Saccharose und 0,05M Acetatpuffer bei pH5 homogenisiert und 2 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Diese Methode wendeten wir im Folgenden an.

In der Nierenrinde ließen sich mit dieser Methode im allgemeinen zwischen 40 und 150 mU/gGewebe mit Trasylol inhibierbare BAEE-esteraseaktivität, entsprechend 0,6-2FU biologischer Aktivität, aktivieren.

Senkten wir den pH-Wert unter pH4 oder überschritten wir pH9, so verschwand die Kallikreinaktivität. Wahrscheinlich wurde Nierenkallikrein unter diesen Bedingungen zerstört.

III Verteilung der Kallikreinaktivität im Nierenparenchym

Wir unterteilten eine entblutete Niere mit einem Skalpell in eine Rindenfraktion und eine Markfraktion. Hierauf stellten wir die durch Trasylol hemmbare BAEE-esterase-aktivität fest. Die Rindenfraktion enthielt 37,5mU/gGewebe, die Markfraktion 18,75mU/gGewebe.
In einem weiteren Versuch unterteilten wir vier Nieren in vier Fraktionen, nämlich in eine äußere (ÄR) und innere (IR) Rindenfraktion und eine äußere (ÄM) und innere (IM) Markfraktion. Von allen vier Nieren bestimmten wir die durch Trasylol inhibierbaren BAEE-esteraseaktivitäten, von zwei Nieren auch die Blutdruckwirkung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

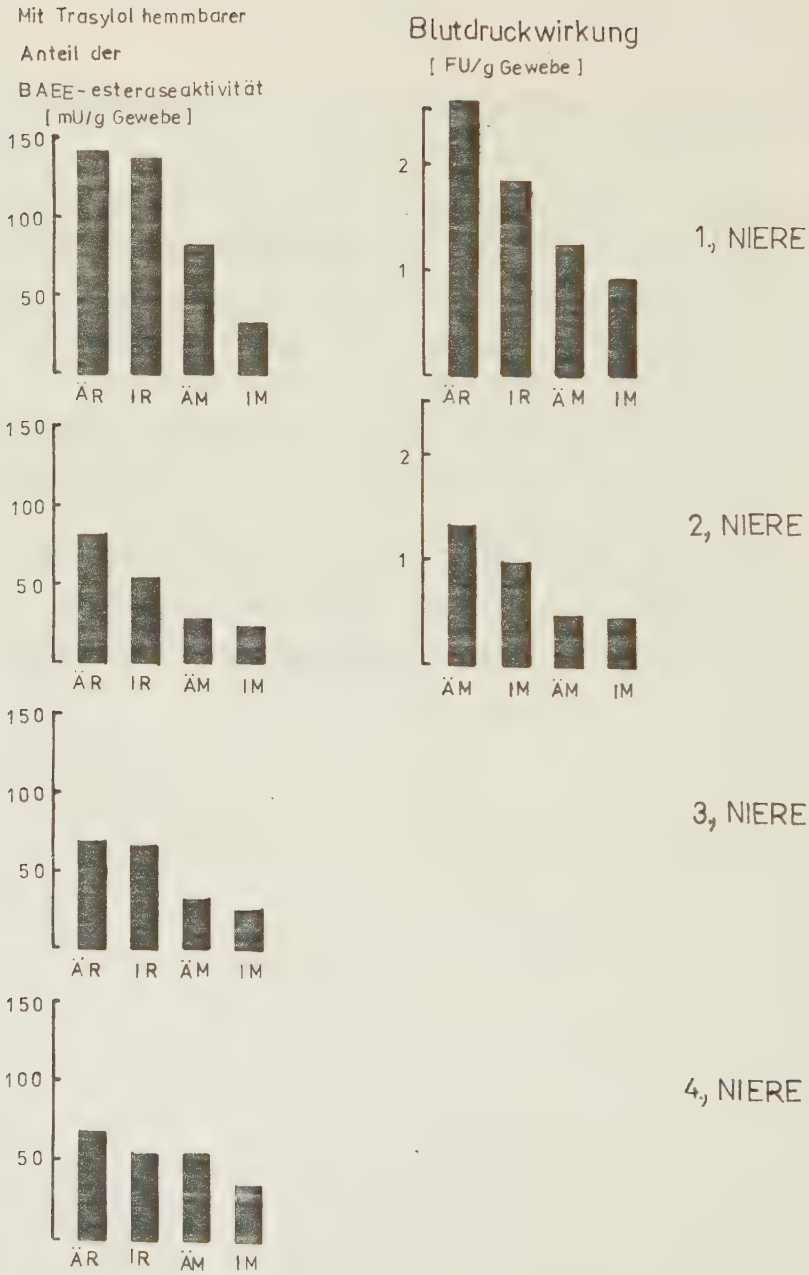

Abbildung 5: Verteilung der Kallikreinaktivität im Nierenparenchym
(ÄR = äußere Rinde, IR = innere Rinde,
ÄM = äußeres Mark, IR = inneres Mark)

Wie gut zu erkennen ist, sank die aktivierbare Kallikreinmenge kontinuierlich von der äußeren Rinde zum inneren Mark ab. Die Blutdruckwirkung verlief parallel mit der durch Trasylol hemmbaren BAEE-esteraseaktivität. Dies ist ein weiterer Beweis, daß die durch Trasylol inhibierbare BAEE-esteraseaktivität auf Kallikrein zurückzuführen ist.

Um in den beiden Markfraktionen eine Blutdrucksenkung messen zu können, war es notwendig sehr große Probemengen dem Versuchstier zu applizieren. Die so ausgelöste Blutdrucksenkung konnte nur zum Teil durch Trasylol inhibiert werden. Sie setzte sich also aus einer Kallikreinwirkung und einem anderen Anteil, wahrscheinlich einer Salzwirkung, zusammen. Dies erklärt die Tatsache, daß in den Markfraktionen die Blutdrucksenkung höher ausfiel als nach Bestimmung der durch Trasylol inhibierbaren BAEE-esteraseaktivität erwartet werden konnte.

IV Herstellung eines angereicherten Nierenpräparates

Durchschnittlich wurden von uns in der Nierenrinde des Schweines etwa 50mU/gGewebe durch Trasylol hemmbare BAEE-esteraseaktivität, entsprechend 0,7FU/gGewebe, aufgefunden. Dies ist im Vergleich zu anderen Organen, wie Pankreas (20FU/gGewebe) oder Submandibularisdrüse (60FU/gGewebe) (1) sehr wenig. Zudem wurde die Aktivität des Nierenkallikreins im Überstand durch Dialysieren oder Gelfiltration großteils zerstört. Die Herstellung eines hochgereinigten Nierenpräparates wäre deswegen mit großen Schwierigkeiten verbunden gewesen und hätte die gegebenen technischen Möglichkeiten weit überstiegen. Wir mußten uns daher mit einer Anreicherung von Nierenkallikrein, die im folgenden beschrieben ist, begnügen.

Etwa 40 Nieren wurden mit je 500 Milliliter 5g% Dextranlösung (mittleres Molekulargewicht 40000, siehe unter BI) entblutet. Hierauf wurden sie in 0,05M Acetatpuffer und 0,15M Saccharose im Verhältnis 1:5 homogenisiert und das Homogenat auf pH-Wert5 eingestellt. Zwei Stunden wurde nun das Homogenat bei etwa 37°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren erhielten wir 13,47 Liter Überstand mit 10,04mU/ml durch Trasylol inhibierbare Kallikreinaktivität.

Diesen Überstand fällten wir mit Ammoniumsulfat, wobei

wir 380 Gramm pro Liter Überstand zugaben. Diese Menge ermittelten wir in Vorversuchen. Den Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung gewannen wir durch Zentrifugieren und Filtrieren. Das Filtrieren war notwendig, da die zur Verfügung stehende Zentrifuge keine ausreichende Drehzahl erreichte. Um den Salzgehalt im Niederschlag möglichst gering zu halten, zentrifugierten wir diesen nochmals in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei 16000 Umdrehungen.

Dann rührten wir 100g DEAE-Cellulose in 1 Liter 0,01M Ammoniumacetatlösung ein und stellten den pH-Wert mit Essigsäure auf pH7 ein. Dazu gaben wir den Niederschlag und vergrößerten hierauf das Volumen durch Zugabe von Aqua dest. auf 40 Liter. Nachdem wir über Nacht mit einem Magnetrührer gerührt hatten, filtrierten wir die DEAE-Cellulose mit einem geeigneten Filter ab.

Die DEAE-Cellulose suspendierten wir nun hintereinander in zwei Salzlösungen aufsteigender Konzentration. So erhielten wir zwei Ablösefraktionen. Die erste Salzlösung bestand aus 5g% NaCl-Lösung und 0,01M Tris-Puffer, wobei der pH-Wert auf 5,4 eingestellt wurde. In der zweiten Salzlösung erhöhten wir die Salzkonzentration auf 7g%, den pH-Wert senkten wir auf pH4,5.

Diese Lösungen dialysierten wir nun gegen 50 Liter Aqua dest. 15 Stunden lang. Während des Dialysierens fiel sehr viel Protein aus, was sich in einer starken Trübung

bemerkbar machte. Die Aktivität der beiden Fraktionen nahm jedoch dabei nicht ab. Nach der Dialyse lyophilisierten wir die beiden Fraktionen.

An diese Reinigungsschritte schlossen wir eine Gelfiltration an einer mit Sephadex G75 gefüllten Säule (Elutionsmittel: Tra 0,1M, 0,1M NaCl, 0,02% NaN_3, pH7,5) an, die keinerlei meßbare Verluste mit sich brachte.

Diesen Reinigungsweg wählten wir, weil wir eine Dialyse möglichst lange umgehen wollten. Durch das Fällen mit Ammoniumsulfat und das Zentrifugieren mit der Hochgeschwindigkeitszentrifuge wollten wir die Salzkonzentration so weit senken, daß eine Adsorption an DEAE-Cellulose ohne Dialysieren möglich war. Obwohl wir eine Dialyse mit diesem Reinigungsverfahren lange umgingen, war die Ausbeute mit 24% dennoch ziemlich gering.

Durch die Anlagerung an DEAE-Cellulose waren entgegengesetzt geladene Proteine abgetrennt worden. Bei der Gelfiltration an Sephadex G75 und der anschließenden Dialyse traten keine Verluste mehr auf. Dies bestätigte unsere Annahme, daß die Verluste beim Dialysieren oder Gelfiltrieren des Homogenatüberstandes durch ausfallende entgegengesetzt geladene Proteine hervorgerufen wurden.

In Tabelle 2 sind die einzelnen Reinigungsschritte und ihre Effizienz zusammengestellt.

Reinigungsschritte	Erhaltene Enzym-einheiten (U)	Reinheits-grad mU/mg Biuret-protein	Ausbeute (%)
Nieren(3588g) homogeni-siert in 0,15M Saccharose, 0,05M Acetatpuffer, pH5, 2h bei 37°C inkubiert, zentrifugiert, 10mU/ml Überstand	134,7 U	2,1mU/mg	100%
Fällen mit Ammonium-sulfat 380g/l, zentrifugieren und filt-rieren, Niederschlag in Ammoniumacetatpuffer bei pH7 aufgenommen	91,5 U	3,6mU/mg	67,5%
Einrühren von 100g DEAE-Cellulose,Verdünnen auf 40 Liter,Abfiltrieren der Cellulose,Suspendieren der Cellulose in: 5g% NaCl,0,1M Tris,pH5,4 Dialysieren,Lyophilisieren und 7g% NaCl,0,1M Tris,pH4,5 Dialysieren,Lyophilisieren	I 24 U II 8 U	15 mU/mg	24%
Sephadex G75 Gelfiltration	I 24 U (II 4 U) nur 4U auf-getragen	30,3mU/mg	

Tabelle 2

V Vergleich des angereicherten Nierenpräparates mit reinsten Kallikreinen

Von Priv. Doz. Dr. Fritz wurden uns freundlicherweise hochgereinigte Kallikreinpräparate vom Schwein aus Pankreas, Glandula submandibularis und Harn zur Verfügung gestellt. Diese verglichen wir mit unserem Präparat.

Die Reinheitsgrade der Präparate waren (BAEE-Konzentration in der Küvette 1mM) :

Pankreaskallikrein	65 U/mg	entsprechend	550 FU/mg
Submandibularisk.	88 U/mg	entsprechend	700 FU/mg
Harnkallikrein	30 U/mg	entsprechend	320 FU/mg

(U/mg = Units/mg Einwaage)

Das von uns angereicherte Nierenpräparat hatte einen Reinheitsgrad von 0,0303 U/mg entsprechend 0,305 FU/mg (U/mg = Units / mg Biuretprotein)

Wie aus den Reinheitsgraden ersichtlich ist, bestand nur etwa ein Promille unseres Nierenpräparates aus Kallikrein. Dennoch ergaben die durchgeführten Vergleiche interessante Ergebnisse.

V-1 Verhalten gegenüber Inhibitoren

V-1-1 Hemmspektrum verschiedener Kallikreine

Wir hemmten die vier untersuchten Organkallikreine mit großen Inhibitormengen (je 500µg/3ml Küvettenvolumen). Die Arbeitsmethode ist unter BIII-2-3 beschrieben. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Die Angaben über Plasmakallikrein sind der Diplomarbeit von G.Wunderer entnommen.(9)

Inhibitor (500µg/3ml Küvetten-volumen)	Pankreas-kallikr.	Submandi-bularis-kallikr.	Harnkal-likrein	Nieren-kallikr.	Plasma-kallikr.
aus Rinderorganen (Trasylol)	+	+	+	+	+
aus Limabohnen	—	—	—	—	—
aus Sojabohnen (SBI-Merk + SBI-Serva)	—	—	—	—	+
aus Eiklar (Ovomucoid)	—	—	—	—	—

Tabelle 3

Das Ergebnis zeigt, daß sich Nierenkallikrein wie die anderen aufgeführten Organkallikreine verhält. Es wird im Gegensatz zu Plasmakallikrein nicht durch Sojabohneninhibitor gehemmt und ist somit eindeutig von diesem unterschieden.

V-1-2 Hemmkurve mit Trasylol

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, war Trasylol gegenüber den untersuchten Gewebskallikreinen der einzig wirksame Inhibitor. Wir versuchten nun mit dieser Hemmwirkung Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit der untersuchten Kallikreine zu ziehen. Dazu hemmten wir Submandibularis-, Pankreas-, Harn- und Nierenkallikrein durch verschiedene Trasylolkonzentrationen. (Methode: siehe B III-2-3)
Das Ergebnis ist in Diagramm 3 wiedergegeben.

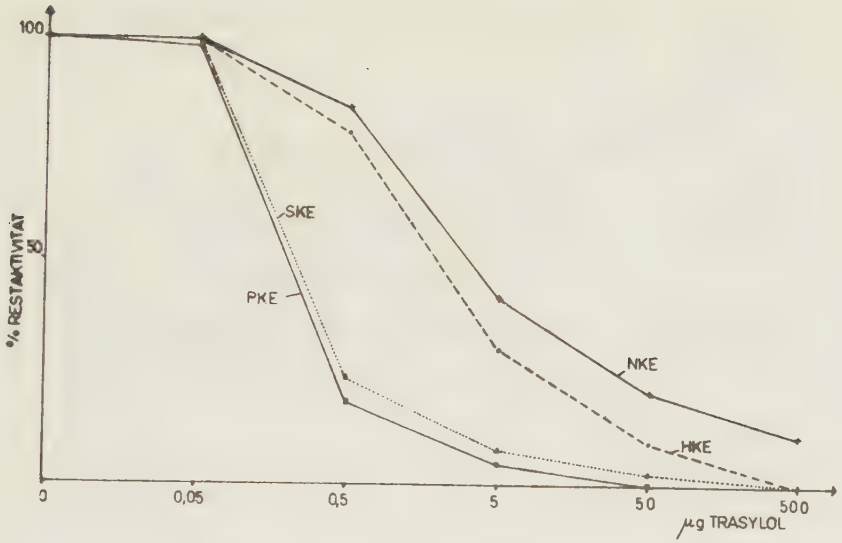

Diagramm 3: Hemmbarkeit der untersuchten Organkallikreine bei verschiedenen Trasylolkonzentrationen in der Küvette (NKE=Nierenkallikrein, HKE=Harnkallikrein, PKE=Pankreaskallikrein, SKE=Submandibulariskallikrein)

Man erkennt, daß sich Nieren- und Harnkallikrein sehr ähnlich verhalten. Die Abweichung ist wahrscheinlich auf die großen Verunreinigungen im Nierenpräparat zurückzuführen, die die Bildung des Enzym-Inhibitorkomplexes beeinflussen.

V-2 Enzymkinetische Untersuchung verschiedener Organkallikreine

Um Ähnlichkeiten der untersuchten Organkallikreine, besonders solche zwischen Harn- und Nierenkallikrein, festzustellen, führten wir kinetische Messungen durch. Dazu bestimmten wir die BAEE-esteraseaktivitäten gleicher Probemengen bei verschiedenen BAEE-Konzentrationen im indirekten Test. Die Meßpunkte wurden zweifach bestimmt. Der jeweilige Mittelwert wurde benutzt.
Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Substratkonzentration (S) ist in Diagramm 4 wiedergegeben. In Diagramm 5 wurden die gleichen Meßpunkte nach Lineweaver-Burk (1/V gegen 1/S) und in Diagramm 6 nach Eadie (V gegen V/S) aufgetragen. Die Absicht lag darin, mit Hilfe dieser Diagramme die große Ähnlichkeit zwischen Nieren- und Harnkallikrein einerseits und Submandibularis- und Pankreaskallikrein andererseits darzustellen. Die Koordinateneinteilung wurde deshalb so gewählt, daß diese Ähnlichkeiten deutlich hervortraten. Es konnten daher aus räumlichen Gründen nicht alle Meßpunkte in jedes Diagramm eingetragen werden.

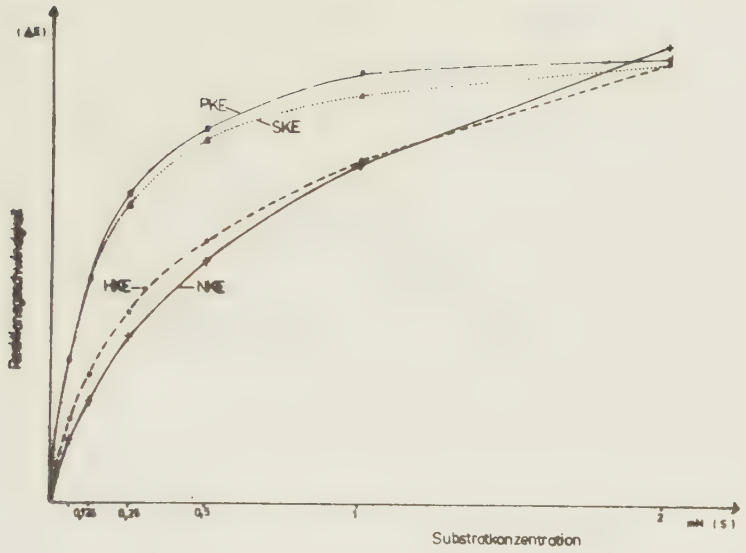

Diagramm 4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (ΔE) von der Substratkonzentration (S) bei den untersuchten Organkallikreinen (NKE=Nierenkallikrein, HKE=Harnkallikrein, PKE=Pankreaskallikrein, SKE=Submandibularis-kallikrein)

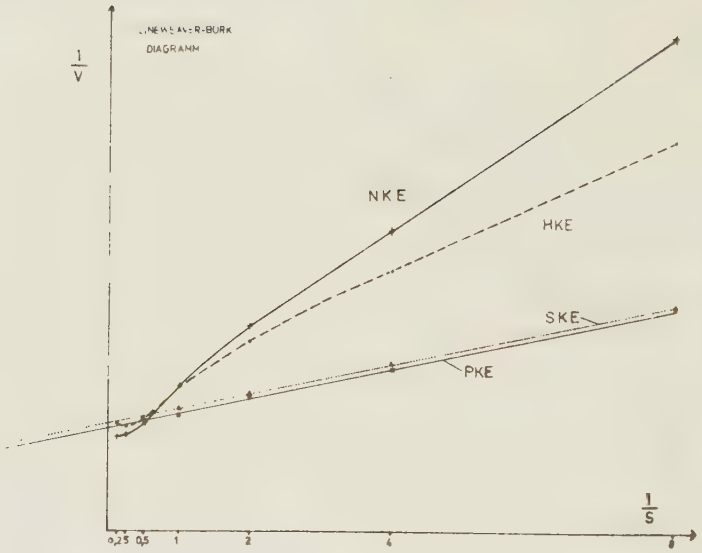

Diagramm 5: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Diagramm 4 dargestellten Werte

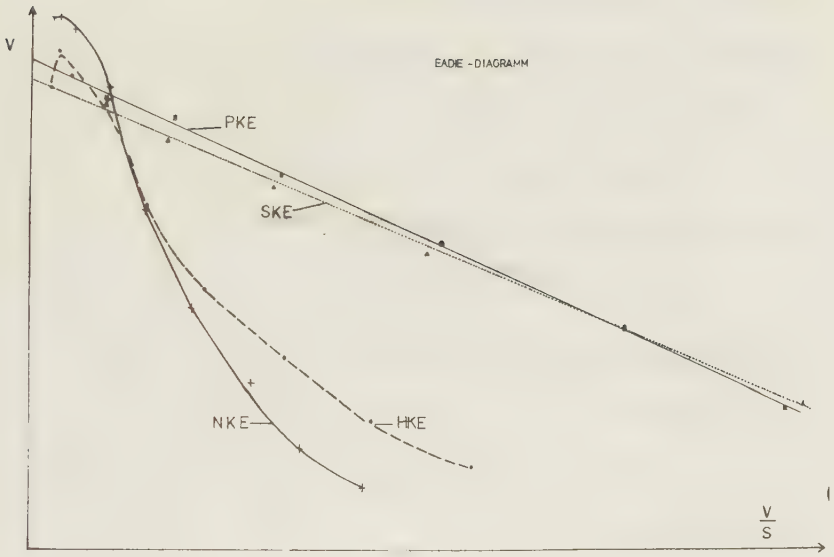

Diagramm 6: Eadie-Diagramm der in Abbildung 4 dargestellten Werte

Nach diesen Meßergebnissen besitzen Pankreas- und Submandibulariskallikrein Michaelis-Menten-Kinetik. Die Michaeliskonstante beträgt für Pankreaskallikrein k_M = 0,145mM und für Submandibulariskallikrein k_M = 0,14mM unter den herrschenden Meßbedingungen. Für Nieren- und Harnkallikrein läßt sich keine Michaeliskonstante ermitteln. Nach unseren Messungen zeigen beide Enzyme zuerst Substrataktivierung, die bei etwa 1,5mM Substratkonzentration in eine Substrathemmung übergeht. Bei etwa 6mM befindet sich nach unseren Meßergebnissen die maximale Spaltungsgeschwindigkeit.
Die Ähnlichkeit zwischen Nieren- und Harnkallikrein auf der einen Seite und Pankreas- und Submandibulariskallikrein auf der anderen Seite zeigt sich in den Diagrammen sehr deutlich.

V-3 Vergleich zwischen biologischer und esterolytischer Aktivität

In Diagramm 7 ist ein Vergleich der esterolytischen Aktivität der untersuchten Präparate mit ihrer blutdrucksenkenden Wirkung dargestellt. Da das enzymkinetische Verhalten der Präparate unterschiedlich war (C V-2), wurde die esterolytische Aktivität bei 0,5mM und 1mM BAEE-Konzentration in der Küvette bestimmt. Außerdem wurde in diesem Diagramm noch ein errechneter Wert eingetragen, der die biologische Wirkung wiedergibt, falls man die BAEE-esteraseaktivität bei 8mM bestimmen würde. Zur Berechnung dieses Wertes wurden die kinetischen Untersuchungen, die unter C V-2 beschrieben sind herangezogen.

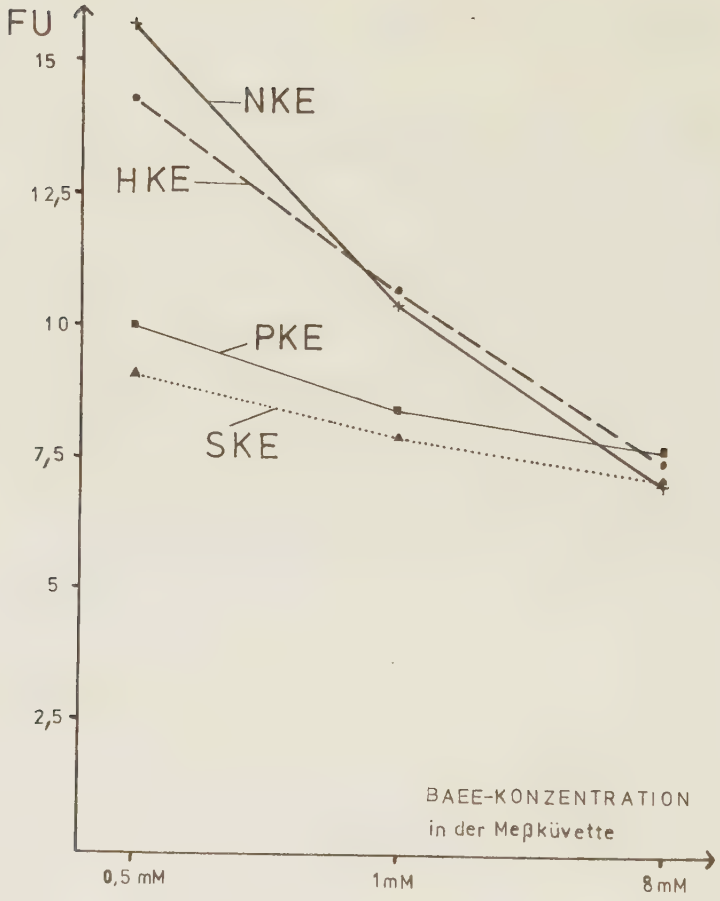

Diagramm 7: Biologische Aktivitäten esterolytisch äquivalenter Kallikreinmengen. Bezogen auf 1µM Substratumsatz pro Minute.
(NKE=Nierenkallikrein, HKE=Harnkallikrein, PKE=Pankreaskallikrein, SKE=Submandibularis-kallikrein)

In Diagramm 7 wurde die biologische Wirksamkeit einer Kallikreinmenge dargestellt, die in einer Minute ein Mikromol Substrat umsetzt, also die biologische Wirkung von 1 Unit Kallikrein. Da die Meßbedingungen bezüglich der BAEE-Konzentration nicht eindeutig definiert waren, wurde die biologische Wirkung bei verschiedenen Meßbedingungen angegeben.

Man erkennt, daß Harn- und Nierenkallikrein nur bei niedrigen BAEE-Küvettenkonzentrationen eine stärkere blutdrucksenkende Wirkung als Submandibularis- und Pankreaskallikrein haben. Auffallend ist, daß bei sehr hoher BAEE-Konzentration in der Meßküvette die biologische Wirksamkeit aller untersuchten Organkallikreine annähernd gleich groß ist.

Das beinahe identische Verhalten von Harn- und Nierenkallikrein tritt wieder deutlich zu Tage.

Die Blutdruckwirkungen der einzelnen Gewebskallikreine sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Auswertung dieser Ergebnisse führte zu den in Diagramm 7 dargestellten Werten.

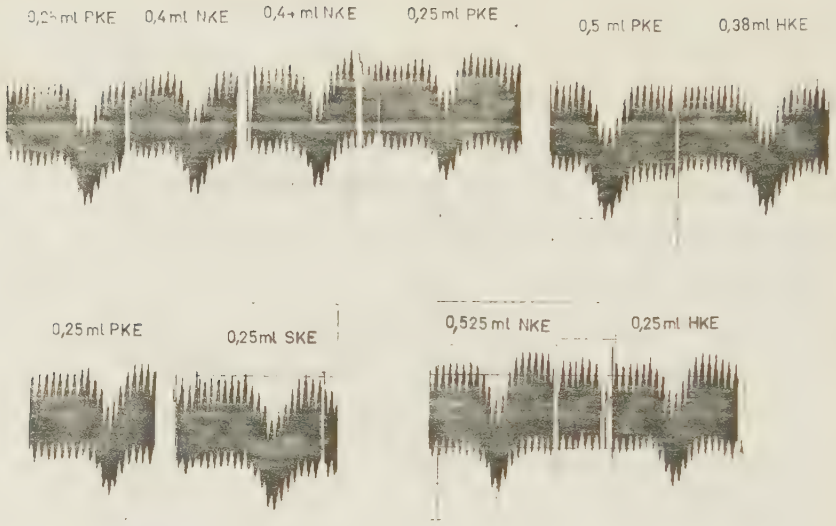

Abbildung 6: Blutdruckwirkung der untersuchten Organkallikreine (PKE=Pankreaskallikrein, SKE=Submandibularisk. HKE=Harnkallikrein, NKE=Nierenkallikrein)

Esterolytische Aktivität bei 0,5mM BAEE-Küvettenkonzentration: PKE=90,1mU/ml; SKE=98,9mU/ml; NKE=34,1mU/ml; HKE=82,9mU/ml.

Esterolytische Aktivität bei 1mM BAEE-Küvettenkonzentration: PKE=107mU/ml; SKE=114mU/ml; NKE=51,4mU/ml; HKE=111mU/ml.

Plasmakallikrein besitzt eine wesentlich geringere biologische Wirksamkeit. Nach Wunderer (9) besitzt 1U Plasmakallikrein (0,5mM BAEE-Konzentration, indirekter Test) nur 0,25-0,55 FU biologische blutdrucksenkende Aktivität. 1U Nierenkallikrein besitzt dagegen eine blutdrucksenkende Wirkung von 15,5FU. Nierenkallikrein ist somit biologisch etwa dreißigmal wirksamer als Plasmakallikrein. Trautschold und Habermann (1,29) geben zwar höhere Werte für die biologische Wirkung des Plasmakallikreins an, aber die biologische Wirkung von esterolytisch den untersuchten Organkallikreinen gleichwertigen Plasmakallikreinmengen ist in allen Fällen deutlich geringer als die der untersuchten Organkallikreine.
Dies ist ein weiterer Beweis, daß wir bei unseren Untersuchungen wirklich Nierenkallikrein und kein Plasmakallikrein erfaßt hatten.

D : RÜCKBLICK UND ERLÄUTERUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse zeigen, daß in der Schweineniere ein inaktives Kallikrein vorkommt, das hauptsächlich in der Nierenrinde lokalisiert ist. In saurem oder alkalischem Milieu tritt eine Umwandlung in aktives Kallikrein ein.

Von Plasmakallikrein unterscheidet sich das aufgefundene Kallikrein in mehreren Kriterien. So wird es im Gegensatz zu Plasmakallikrein nicht durch Sojabohneninhibitor gehemmt. Weiterhin unterscheidet es sich deutlich bezüglich der Relation zwischen biologischer und esterolytischer Wirkung.

Wie die durchgeführten Vergleiche mit anderen Kallikreinen zeigen, ist das aufgefundene Enzym dem Harnkallikrein sehr ähnlich. Die Ähnlichkeiten treten in der Hemmkurve, den kinetischen Untersuchungen und beim Hundeblutdrucktest deutlich zu Tage, obwohl jede dieser Untersuchungen andere Enzymeigenschaften anspricht. Die geringen Unterschiede zwischen Harn- und Nierenkallikrein sind wahrscheinlich auf den sehr unterschiedlichen Reinheitsgrad der Präparate zurückzuführen.

Die Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, daß Nierenkallikrein in der Niere gebildet wird und als Harnkallikrein von der Niere ins Tubuluslumen sezerniert wird. Daß Kallikrein von der Niere aus dem Blutplasma

aufgenommen wird und das nachgewiesene Nierenkallikrein nur ein Übergangsstadium darstellt, erscheint sehr unwahrscheinlich, da die untersuchten Organkallikreine deutlich von Harn- und Nierenkallikrein abweichende Eigenschaften haben und auch im Blut kein Enzym bekannt ist, das Eigenschaften wie Harn- und Nierenkallikrein besitzt.

Von großer Bedeutung wäre die Klärung der physiologischen Funktion des Nierenkallikreins. So wäre es denkbar, daß zum Teil ungeklärte Phänomene der Niere, wie pathophysiologische Veränderungen bei herabgesetzter Durchblutung im Schock oder die häufig beobachtete Hypertonie bei degenerativen Nierenkrankheiten, ursächlich mit dem Nierenkallikrein in Beziehung stehen.

Literatur

1 Frey,E.K.,Kraut,H.,Werle E.,R.Vogel,G.Zickgraf-Rüdel und I.Trautschold: Das Kallikrein-Kininsystem und seine Inhibitoren;F.Enke,Stuttgart 1968

2 Werle,E.: Kinine;Journal Mondial de Pharmacie;No.3,1968, PP.291-312

3 Werle,E.: Plasmakinine;München Med.Wschr.105,2486 (1963)

4 Horton,E.W.,J.Physiology 148,267 (1959)

5 Trautschold,I.: Habilitationsschrift der Med.Fakultät München 1965

6 Trautschold,I. und E.Werle: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren

7 Webster,M.E. und Ratnoff,O.D.: Role of Hageman Faktor in the Aktivation of Vasodilatator Aktivity in Human Plasma. Nature 192,180 (1962)

8 Vogel,R.,Trautschold,I. und Werle,E.: Natürliche Proteinasen-Inhibitoren Stuttgart 1966

9 Wunderer,G.: Diplomarbeit Februar 1972 Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

10 Werle,E. und R.Vogel: Über die Freisetzung einer kallikreinartigen Substanz aus Extrakten verschiedener Organe Arch.int.pharmacodyn.Ther.,131,257-261

11 Werle,E. und R.Vogel: Arch.int.Pharmacodyn.126,171(1960)

12 Werle,E.,R.Busse,A.Schmal: Z.ges.exp.Med.148,168-172 (1968)

13 Vogel,R.,G.Rüdel und L.v.Ziegesar: Arzneimittelforschung 12,881 (1962)

14 Vogel,R.,L.F.Göldel und M.Hutzel: Arzneimittelforsch. 12,885 (1962)

15 Thurau,K.: Am.J.Med.26,698 (1964)

16 Murakami,N.,Fujioka,H.Boei Eisei.,6(1959)18 (in Japanese)

17 Michihiro Kondo: Mie,Medical Journal Vol XVIII,No3,1969

18 Carvalho,I. and Diniz,C.: Kinin-forming Enzym (Kininogenin) in Homogenates of Rat Kidney;Biochem. biophys.Acta 128,136-148

19 De Carvalho,I.F.&Diniz,C.R.: (1963) Cininogenina no tecido renal do rato;Cienc.Cult.,S.Paulo,15,286-287

20 De Carvalho,I.F.u.Diniz,C.R.: (1964) Kinin-forming enzyme (kininogenin) in rat kidney;Ann.N.Y.Acad.Sci., 116,912-917

21 Nustad,K.: (1970a) The relationship between kidney and urinary kininogenase;Br.J.Pharmac.,39,73-86

22 Nustad,K.: (1970b) Localization of kininogenase in the rat kidney;Br.J.Pharmac.39,87-98

23 Nustad,K. and D.Rubin: Subcellular localization of renin and kininogenase in the rat kidney;Br.J.Pharmac., 40,326-333

24 Seiki Hori,Sunio Masumara,Katsuhiro Mizuta and Michihiro Kondo;Mie Medical Journal Vol.XVIII,No.3,1969

25 Bergmeyer,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse (1012-1036)

26 Photometrische Methoden-Medizin: Eppendorf Broschüre (1967)

27 Werle,E.,G.Leysath und A.Schmal: Über das Verhalten des Kininogenspiegels nach Nieren- und Nebennieren-extirpation bei der Ratte;Z.Physiol.Chem.,349:107,1968

28 Sephadex Gelfiltration in Theorie u. Praxis,Pharmacia Uppsala (1969)

29 Habermann,E. und W.Klett,Biochem.Z.346,133 (1966)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle für die Überlassung des Themas sowie die wohlwollende Unterstützung und die vielen guten Ratschläge bei der Ausführung der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.
Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes danken, die mir bei meiner Arbeit behilflich waren.

L E B E N S L A U F

Ich, Brurolf Briegel, wurde am 30. November 1948 als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Josef Briegel und seiner Ehefrau Brunhilde Briegel, geborene Spiegel, in Ottobeuren im Allgäu geboren.

1954 trat ich in die Volksschule in Ottobeuren ein. 1958 wechselte ich auf das Humanistische Gymnasium in Memmingen über. Im Juni 1968 legte ich an dieser Schule das Abitur ab.

Seit dem Wintersemester 1968/69 studiere ich an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München Medizin.

Hier legte ich nach dem Sommersemester 1969 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem Wintersemester 1970/71 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im ersten Halbjahr 1974 schloß ich mein Studium mit dem Staatsexamen und der Promotion ab.